

健康汉族孕妇 GJB2 基因突变产前筛查分析

李珊珊, 王琳琳, 吕巍, 杨树法, 于璐 (首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院遗传代谢实验室 100026)

【摘要】 目的 确定健康汉族孕妇的 GJB2 基因突变产前筛查。方法 对 475 例研究对象基因组 DNA 提取, 聚合酶链反应扩增, 基因芯片检测 GJB2、GJB3、SLC26A4 及线粒体 12S rRNA 4 个基因 9 个位点; 直接测序检测其 GJB2 突变谱情况。结果 利用耳聋基因芯片, 检出 15 例研究对象携带 6 种致病突变, 包括 14 例杂合突变: GJB2 基因检出 3 个框移突变, 176-191 del 16、235del C 和 299-300del AT, 35del G 未检出; SLC26A4 基因检出 2 个错义突变, 2168A>G 和 IVS7-2A>G; 检出 1 例线粒体 12S rRNA 1555A>G 纯合型突变。直接测序法检测整个 GJB2 编码区, 检出 176-191del 16、235del C、299-300del AT、109G>A 4 种致病突变; 79G>A、341A>G、478A>G 和 608T>C 4 种多态性; 11G>A、187G>T、372G>A、558G>A 4 种未分类突变。其中 211 例研究对象至少携带 1 种 GJB2 突变, 占检测总数的 44.4%。结论 该研究有助于孕妇产前耳聋基因突变的筛查分析, 辅助孕妇遗传性听力损失的遗传咨询。

【关键词】 突变频率; GJB2 基因突变; 遗传性耳聋

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.029 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)17-2556-04

Prenatal screening for mutations in GJB2 gene in healthy Han pregnant women LI Shan-shan, WANG Lin-lin, LYU Wei, YANG Shu-fa, YU Lu (Genetic Metabolism Laboratory, Affiliated Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital Capital Medical University/Beijing Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing 100026, China)

【Abstract】 Objective To determinate the prenatal screening of mutations of the major deafness gene GJB2 in healthy Han pregnant women. **Methods** The gene DNA extraction and amplification was performed in 475 healthy Han pregnant women as the research subjects. 9 loci of GJB2, GJB3, SLC26A4 and mitochondrial 12S rRNA were detected by the DNA microarray analysis. The direct DNA sequencing was used for detecting the GJB2 mutation situation. **Results** The deafness gene microarray analysis showed six types of pathogenic mutations in 15 research subjects, including 14 cases of heterozygous mutation; 3 frameshift mutations in GJB2 gene, non-mutation was detected in 176-191 del 16, 235del C and 299-300del AT, 35del G; 2 missense mutations in SLC26A4 gene, 2168A>G and IVS7-2A>G; 1 case of mitochondrial 12S rRNA 1555A>G homozygotic type mutation was detected out. The whole GJB2 coding region was detected by the direct DNA sequencing, including 4 kinds of detected pathogenic mutation 176-191del 16, 235del C, 299-300del AT and 109G>A, 4 kinds of polymorphism 79G>A, 341A>G, 478A>G and 608T>C and 4 kinds of non-classification mutation 11G>A, 187G>T, 372G>A and 558G>A. Among them, 211 subjects carried at least 1 kind of GJB2 mutation, accounting for 44.4% of the detected total number. **Conclusion** This research is conducive to screening analysis of prenatal deafness gene mutation and assisted genetic counselling for hereditary hearing loss.

【Key words】 mutation frequency; GJB2 gene mutation; inherited deafness

听力障碍是一种常见的疾病, 发生率 1:1 000, 多方面原因可造成耳聋, 其中 50%~60% 与遗传因素有关^[1]。70% 遗传性耳聋被认为是非综合征性耳聋 (NSHD), 特点是只有听力损失, 不伴有其他临床症状^[2]。NSHD 具有高度的遗传异质性, 国内外学者对其进行了较深入研究, 不断地定位新的耳聋基因位点和克隆新的耳聋基因。GJB2 基因是最常见的 NSHD 突变基因, 主要引起先天性重度、极重度感音神经性耳聋^[2]。本研究通过对 475 例健康孕妇 GJB2 基因进行产前筛查, 初步分析健康孕妇人群耳聋基因突变情况, 并报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 475 例血标本均来自 2012 年 12 月至 2013 年 5 月本院门诊健康孕妇; 年龄 19~40 岁, 平均 30.2 岁; 汉族。标准调查问卷自我测评均无听力损失。标本 2~8℃ 保存。

1.2 仪器与试剂 全血 DNA 提取试剂盒 (天根生物), 遗传

性耳聋基因芯片检测试剂盒 (博奥生物有限公司); PCR 仪 (博日公司); 芯片杂交仪、芯片扫描仪、芯片洗干仪 (博奥生物有限公司); ABI 3100 DNA 测序仪 (PE 公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 取 EDTA 抗凝静脉血 0.5 mL, 按试剂盒说明书进行全血 DNA 提取, DNA 标本 -20℃ 保存。

1.3.2 耳聋基因芯片检测 按照遗传性耳聋基因芯片检测试剂盒说明书, 检测研究对象的耳聋基因 GJB2 (35del G、176-191del 16、235del C 和 299-300del AT), GJB3 (538C>T), 线粒体 DNA 12S rRNA (1494C>T、1555A>G), SLC26A4 (2168A>G 和 IVS7-2A>G) 突变情况。

1.3.3 直接测序检测 根据 Genbank 中标准 GJB2 序列 (NM_004004), 应用 Primer 5.0 设计测序引物, 上游引物: 5'-TGC TTG CTT ACC CAG ACT-3', 下游引物: 5'-GGT TGC

CTC ATC CCT CTC-3'。PCR 扩增反应体系为 10 μL, 体系中含有: 100 ng 基因组 DNA, 2.5 μL PCR 缓冲液, 1.25 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 每个引物 10 pmol, 1 U Taq DNA 聚合酶。反应条件: 37 °C 10 min, 95 °C 预变性 5 min, 后以 95 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s 和 72 °C 延伸 30 s, 以此重复 33 个循环, 72 °C 延伸 10 min。应用 ABI3100 DNA 测序仪, 利用以上引物进行正反向双向测序。应用 NCBI BLAST 比对。

1.4 统计学处理 95% 可信区间比较本研究中检测出的突变频率与其他亚洲人群突变频率的差异。

2 结 果

2.1 GJB2 基因突变结果 采用耳聋基因芯片检测技术检出 11 例 GJB2 基因突变, 包括 1 例 176-191del 16, 6 例 235del C, 4 例 299-300del AT 突变; 35del G 未检出, 见表 1。475 例标本中有 211 例检出至少携带一种突变位点, 突变频率 44.4%。检出的 4 种致病突变中, 除 109G>A 突变外, 测序均与耳聋基因芯片检测结果一致。此外, 通过测序技术检出 79G>A、

341A>G、478A>G 和 608T>C 4 种非致病性多态; 79G>A 和 341A>G 在本研究中等位基因频率分别为 25.68% 和 19.89%, 是最常见的突变位点, 见表 2。对健康孕妇 GJB2 基因第 2 外显子直接测序, 检出 12 个突变位点, 包括 4 个致病突变(109G>A、176-191del 16、235del C、299-300del AT), 4 个多态性位点(79G>A、341A>G、478A>G、608T>C), 4 个未分类突变位点(11G>A、187G>T、372G>A、558G>A), 见表 3。11G>A、372G>A、558G>A 和 187G>T 突变与遗传性耳聋的相关性尚未明确, 558G>A 检出 2 例, 等位基因频率 0.42%。此外, 299-300del AT 突变位点在本研究中的突变频率为 0.42%。通过测序检出在相同的等位基因同时出现一种或多种杂合突变, 如 [79G>A/wt]、[109G>A/341A>G] 和 [(79G>A+109G>A+341A>G)/wt]; 在相同的等位基因同时出现纯合、杂合突变, 如 [11G>A/11G>A]+[79G>A/341A>G]、[79G>A/79G>A]+[341A>G/wt] 和 [341A>G/341A>G]+[79G>A/wt]。

表 1 475 例健康孕妇 GJB2 基因突变耳聋基因芯片检测结果分析

| 突变基因 | 突变位点 | 等位基因(研究对象/等位基因=475/950) | | | 突变频率(%) |
|----------|---------------|-------------------------|----------|--------------|---------|
| | | 杂合型(n/n) | 纯合型(n/n) | 等位基因频率[n(%)] | |
| GJB2 | 35del G | 0/0 | 0/0 | 0(0.00) | 0.00 |
| | 176-191del 16 | 1/1 | 0/0 | 1(0.11) | 0.21 |
| | 235del C | 6/6 | 0/0 | 6(0.63) | 1.26 |
| | 299-300del AT | 4/4 | 0/0 | 4(0.42) | 0.84 |
| GJB3 | 538C>T | 0/0 | 0/0 | 0(0.00) | 0.00 |
| 12S rRNA | 1494C>T | 0/0 | 0/0 | 0(0.00) | 0.00 |
| | 1555A>G | 0/0 | 1/2 | 2(0.21) | 0.21 |
| SLC26A4 | 2168A>G | 1/1 | 0/0 | 1(0.11) | 0.21 |
| | IVS7-2A>G | 2/2 | 0/0 | 2(0.21) | 0.42 |

表 2 GJB2 基因突变直接测序检测基因型结果分析

| 基因 | 基因型 | 突变频率 [n(%)] |
|-------------------------|------------------------|----------------|
| GJB2 | [79G>A/79G>A] | 11(2.32) |
| | [79G>A/79G>A]+ | 42(8.84) |
| | [341A>G/341A>G] | 27(5.68) |
| | [79G>A/wt*] | 73(15.37) |
| | [79G>A/wt]+[341A>G/wt] | 14(2.95) |
| | [79G>A/79G>A]+ | 1(0.21) |
| | [341A>G/wt] | 2(0.42) |
| | [11G>A/11G>A]+ | 2(0.42) |
| | [79G>A/341A>G] | 2(0.42) |
| | [341A>G/341A>G] | 2(0.42) |
| | [341A>G/341A>G]+ | 1(0.21) |
| | [79G>A/wt] | 8(1.68) |
| | [341A>G/341A>G]+ | 6(1.26) |
| | [109G>A/109G>A] | 1(0.21) |
| | [109G>A/109G>A] | 1(0.21) |
| | [109G>A/wt] | 1(0.21) |
| | [109G>A/79G>A] | 1(0.21) |
| [109G>A/341A>G] | 2(0.42) | |
| [109G>A/wt]+[79G>A/wt]+ | 1(0.21) | |
| [341A>G/wt] | 1(0.21) | |
| [176-191del C/wt] | 1(0.21) | |
| [187G>T/187G>T] | 1(0.21) | |
| [235del C/wt] | 6(1.26) | |

续表 2 GJB2 基因突变直接测序检测基因型结果分析

| 基因 | 基因型 | 突变频率 [n(%)] |
|--------------|------------------------|----------------|
| GJB2 | [299-300del AT/wt] | 4(0.84) |
| | [372G>A/372G>A] | 1(0.21) |
| | [478A/G/wt] | 1(0.21) |
| | [558G>A/558G>A] | 2(0.21) |
| | [608T>C/608T>C] | 2(0.42) |
| | [2168A>G/wt]+[79G>A/ | 1(0.21) |
| SLC26A4+GJB2 | 79G>A]+[341A>G/341A>G] | 1(0.21) |
| | [IVS7-2A>G/wt]+[79G>A/ | 1(0.21) |
| | 79G>A]+[341A>G/341A>G] | |

注: * wt 表示野生型。

表 3 475 例健康孕妇 GJB2 基因突变直接测序检测结果分析

| 突变位点 | 突变类型 | 等位基因(研究对象/等位基因=475/950) | | |
|--------|-----------|-------------------------|--------------|------------------|
| | | 杂合型 (n/n) | 纯合型 (n/n) | 等位基因频率 [n(%)] |
| 79G>A | 多态性 | 106/106 | 69/138 | 244(25.68) |
| 341A>G | 多态性 | 91/91 | 49/98 | 189(19.89) |
| 478A>G | 多态性 | 1/1 | 0/0 | 1(0.11) |
| 608T>C | 多态性 | 0/0 | 2/4 | 4(0.42) |
| 109G>A | 致病性(错义突变) | 10/10 | 9/18 | 28(2.95) |

续表 3 475 例健康孕妇 GJB2 基因突变直接测序检测结果分析

| 突变位点 | 突变类型 | 等位基因(研究对象/等位基因=475/950) | | |
|---------------|-----------|-------------------------|-------|---------|
| | | 杂合型 | 纯合型 | 等位基因频率 |
| | | (n/n) | (n/n) | [n(%)] |
| 176-191del 16 | 致病性(框移突变) | 1/1 | 0/0 | 1(0.11) |
| 235del C | 致病性(框移突变) | 6/6 | 0/0 | 6(0.63) |
| 299-300del AT | 致病性(框移突变) | 4/4 | 0/0 | 4(0.42) |
| 11G>A | 未分类 | 0/0 | 1/2 | 2(0.21) |
| 187G>T | 未分类 | 0/0 | 1/2 | 2(0.21) |
| 372G>A | 未分类 | 0/0 | 1/2 | 2(0.21) |
| 558G>A | 未分类 | 0/0 | 2/4 | 4(0.42) |

注:109G>A 为致病性存在争议;187G>T 为有研究表明错义突变。

表 4 235del C 突变在不同东亚国家健康人群中的突变频率比较

| 人群类型 | 研究量(n) | 235del C 杂合突变量(n) | 突变频率(%) | 95%CI | 参考文献 |
|--------|--------|-------------------|---------|-----------|--------------------------------------|
| 日本-1 | 96 | 2 | 2.08 | 0.25~7.32 | Abe 等 ^[3] |
| 日本-2 | 147 | 2 | 1.36 | 0.17~4.83 | Ohtsuka 等 ^[4] |
| 韩国-1 | 100 | 1 | 1 | 0.02~5.45 | Park 等 ^[5] |
| 韩国-2 | 2 072 | 26 | 1.25 | 0.82~1.83 | Han 等 ^[6] |
| 韩国-3 | 1 256 | 11 | 0.88 | 0.44~1.56 | Shin 等 ^[2] |
| 泰国 | 205 | 1 | 0.49 | 0.01~2.69 | Wattanasirichaigoon 等 ^[7] |
| 中国台湾 | 432 | 9 | 2.08 | 0.96~3.92 | Hwa 等 ^[8] |
| 中国-1 | 115 | 1 | 0.87 | 0.02~4.75 | Wang 等 ^[9] |
| 中国-2 | 109 | 3 | 2.75 | 0.57~7.83 | Chen 等 ^[10] |
| 中国-3 | 126 | 2 | 1.59 | 0.19~5.62 | Chen 等 ^[11] |
| 汉族健康孕妇 | 475 | 6 | 1.26 | 0.46~2.73 | 本研究 |

3 讨 论

遗传性 NSHI 有高度的遗传异质性,本研究利用基因芯片对 475 例健康汉族孕妇遗传性耳聋基因进行产前筛查,检出 6.3% 携带有 GJB2 基因突变,0.8% 检出带有线粒体 12S rRNA 和 SLC26A4 基因突变,GJB3 基因的 538C>T 基因突变未检出。通过直接测序,475 例孕妇中有 211 例检测到至少携带一种 GJB2 致病突变和(或)多态,占 44.4%。其中 235del C 杂合型突变 9 例,突变频率 1.26%,类似于韩国人群(1.11%),但高于泰国人群(0.49%),低于日本人群(1.65%)和中国台湾人群(2.08%),235del C 突变频率差异无统计学意义($P>0.05$)。299-300del T 突变主要发生在东亚地区^[3,5],其他地区突变频率未见报道。本研究检出 4 例 299-300del AT 杂合型突变,突变频率为 0.84%。检出 1 例 176-191del 16 突变,且为杂合型突变,突变频率 0.21%。

等位基因 109G>A 与遗传性 NSHI 的相关性一直存在争议。Kelly 在 1998 年首次报道 109G>A 为 NSHI 的基因多态性,仅在健康人群中检出,突变频率为 0.5%^[12]。后续报道 109G>A 作为一种致病突变以纯合和(或)杂合突变的形式存在,在健康人群中没有检出或其检出的突变频率低于耳聋患者的突变频率^[13-14]。对东亚人群研究发现,109G>A 与轻、中度听力损失相关;在中国、韩国、泰国的中度听力损失患者中检出高于健康对照组^[15-16]。本研究 109G>A 等位基因突变频率为 2.95%(28/950),10 例为杂合型突变,9 例为纯合型突变,19

2.2 GJB3、线粒体 12S rRNA 和 SLC26A4 突变结果 GJB3 基因 538C>T、线粒体 12S rRNA 基因 1494C>T 突变位点未检出,见表 3。检出 1 例线粒体 12S rRNA 基因 1555A>G 纯合突变;1 例 SLC26A4 基因 2168A>G/杂合突变,2 例 IVS7-2A>G 杂合突变,突变频率分别为 0.11% 和 0.21%。检出 2 例样本同时带有 GJB2 和 SLC26A4 基因的位点突变,分别为:2168A>G/wt+79G>A/79G>A+341A>G/341A>G 和 IVS7-2A>G/wt+79G>A/79G>A+341A>G/341A>G。

2.3 GJB2 基因 235del C 在不同研究中的突变频率 本研究 235del C 突变频率为 1.26%(95%CI,0.46~2.73),与不同东亚国家健康人群中的 235del C 突变频率相比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

例均未检出与其他突变类型结合的复合杂合突变。与部分文献报道相矛盾,分析原因有以下几点:第一,研究对象选择存在偏倚,以往研究对照组中未包含 109G>A 纯合型的正常听力者;第二,109G>A 突变引起的中度听力损伤相对起病晚、病程进展慢,而且 109G>A 突变引起的听力损伤的病理症状可能由其他基因或环境因素调控^[14,17-18];本研究中,109G>A 纯合型的研究对象还未表现出听力损伤的症状;第三,109G>A 突变可能不是致病基因位点,与 GJB2 或其他基因上的等位基因发生连锁不平衡作用,作者所观察的耳聋临床症状是 109G>A 突变跟随着其他等位基因作用造成的,将在后续进一步追踪研究对象的听力情况。

79G>A,341A>G,478A>G 和 608T>C 在本研究中均有检出,79G>A,341A>G 等位基因频率分别为 25.68%、19.89%,是最普遍的多态类型;检出 136 例 79G>A,341A>G 纯合/杂合突变,占 28.6%。79G>A,341A>G 彼此相关,易在同一个体中同时出现,而且一些功能研究发现,携带此突变质粒转染后的细胞,由于缝隙连接蛋白障碍而导致钙离子转导障碍^[16]。研究中还检出 11G>A,187G>T,372G>A,558G>A 4 种未分类突变。11G>A 在亚洲人群、非洲裔美国人人群中突变频率较低,与本研究等位基因突变频率(2/950,0.21%)结果相似^[18]。而以往研究中仅在耳聋患者检出 187G>T 突变,有学者认为更可能为致病性突变而不是非致病性多态^[10]。以上多态性及未分类突变是否与遗传性耳聋相关,还需要进一步

研究验证。

通过 GJB2 基因的直接测序,发现研究人群中 109G>A 突变、235del C 突变和 299-300del AT 突变频率分别为 5.90%、1.26% 和 0.84%,是 GJB2 基因中较为普遍的致病突变类型。以往研究中学者发现,在中国人群 GJB2 基因中,235del C 突变和 299-300del AT 突变是突变率比较高的类型之一^[10]。在健康人群中产前筛查检出以上两种突变,建议其进行遗传性耳聋遗传咨询,同时,配偶进行相应的遗传性耳聋基因突变位点筛查,进而分析胎儿是否携带相应突变位点;而对于有听力损伤症状者,同时建议其直系亲属进行相应突变检测,明确该遗传因素对家族的影响。109G>A 突变是否是致病突变还存在争议,近来研究发现其与中、轻度听力损失相关,也建议增加为产前筛查 GJB2 基因的突变位点^[15]。

此外,通过耳聋芯片检出 1 例线粒体 12S rRNA 1555A>G 纯合型突变,此突变可引起氨基糖苷类致药物性耳聋。该研究对象自评无听力损伤,自述未服用过此类药物。因带有该基因突变者,使用氨基糖苷类药物后会造成双侧永久性听力损失,不使用则不发病,建议其在今后避免使用此类药物。因其为母系遗传的特点,同时建议其母系亲属进行相应突变检测,明确该遗传因素对家族的影响,避免使用此类药物。

因以上突变在中国汉族人群突变情况以及遗传性耳聋对患者生活质量的影响,对于分娩后的新生儿开展遗传性耳聋基因的筛查也尤为重要,并对携带致病突变的新生儿及其亲属进行遗传指导及婚育指导。

本研究通过直接测序法进一步验证了耳聋芯片检测以上 4 种致病基因的准确性,为进一步大范围开展耳聋芯片检测提供了数据基础。作者在健康孕妇中检测出遗传性耳聋基因相关基因位点突变,其可能会增加下一代听力障碍的风险,进一步证明产前筛查遗传性耳聋基因的重要性。进行遗传性耳聋基因的产前筛查,能够为孕妇提供早期健康的建议,阻止疾病进展。

参考文献

[1] Cohen MM, Gorlin RJ. Hereditary hearing loss and its syndromes. In *Origins of Oxford monographs on medical genetics*[M]. New York: Oxford University Press, 1995: 9-21.

[2] Shin YK, Bom YL, Ji HL, et al. Determination of the carrier frequencies of selected GJB2 mutation in the Korean population[J]. *Int J Audiol*, 2011, 50(7): 694-698.

[3] Abe S, Usami S, Shinkawa H, et al. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese[J]. *J Med Genet*, 2000, 37(6): 41-43.

[4] Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, et al. GJB2 deafness gene shows a specificity spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation[J]. *Hum Genet*, 2003, 112(53): 329-333.

[5] Park HJ, Hahn S, Chun Y, et al. Connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss[J]. *Laryngoscope*, 2000, 110(27): 1535-1538.

[6] Han SH, Park HJ, Kang EJ, et al. Carrier frequency of GJB2 (connexin-26) mutations causing inherited deafness

in the Korean population[J]. *J Hum Genet*, 2008, 53(14): 1022-1028.

[7] Wattanasirichaigoon D, Limwongse C, Jariengprasert C, et al. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26(GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals[J]. *Clin Genet*, 2004, 66(3): 452-460.

[8] Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, et al. Mutation spectrum of the connexin 26(GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness[J]. *Genet Med*, 2003, 5(2): 161-165.

[9] Wang SH, Hu ZM, Xiao Z, et al. GJB2(connexin 26) gene mutation screen in patients with nonsyndromic hearing loss in Human[J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(21): 498-503.

[10] Chen D, Chen X, Cao K, et al. High prevalence of the connexin26(GJB2) mutation in Chinese cochlear implant recipients[J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2009, 71(23): 212-215.

[11] Chen GM, He F, Fu SQ, et al. GJB2 and mitochondrial DNA 1555A>G mutations in students with hearing loss in the Hubei Province of China[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2011, 75(7): 1156-1159.

[12] Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene(GJB2) that cause autosomal recessive(DFNB1) hearing loss[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(11): 792-799.

[13] Huculak C, Bruyere H, Nelson TN, et al. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(36): 2394-2400.

[14] Pollak A, Skorka A, Mueller-Malesinska M, et al. M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance[J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143(38): 2534-2543.

[15] Li L, Lu J, Tao Z, et al. The p. V37I exclusive genotype of GJB2: a genetic risk-indicator of postnatal permanent childhood hearing impairment[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e36621.

[16] So YK, Gibeom P, Kyu-Hee H, et al. Prevalence of p. V37I variant of GJB2 in mild or moderate hearing loss in a pediatric population and the interpretation of its pathogenicity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61592.

[17] Bruzzone R, Veronesi V, Gomes D, et al. Loss-of-function and residual channel activity of connexin 26 mutations associated with non-syndromic deafness[J]. *FEBS Lett*, 2003, 533(61): 79-88.

[18] Palmada M, Schmalisch K, Bohmer C, et al. Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(16): 112-118.